

DNA-Assemblierung mittels Affinitätsbindung für die ultraempfindliche Proteindetektion

Hongquan Zhang, Feng Li, Brittany Dever, Chuan Wang, Xing-Fang Li und X. Chris Le*

Affinitätsbindung · Analysemethoden · Biosensoren ·

DNA-Assemblierung · Proteinnachweis

Jüngste Fortschritte auf dem Gebiet der DNA-Assemblierung und der Affinitätsbindung haben zu aufregenden neuen Entwicklungen bei Nanosensoren und ultraempfindlichen Nachweismethoden für spezifische Proteine geführt.^[1–6] Diese Sensoren und Nachweissysteme haben drei attraktive Eigenschaften gemeinsam:^[1, 4, 7] 1) Der Proteinnachweis gelingt mittelbar durch die Detektion amplifizierter DNA, wodurch die Empfindlichkeit drastisch erhöht wird. 2) Die Zusammenlagerung der DNA wird durch Affinitätsbindung von zwei oder mehr „Sonden“ zu einem einzelnen Analytmolekül ausgelöst, was eine erhöhte Spezifität bedingt. 3) Der Nachweis erfolgt in Lösung ohne die Notwendigkeit einer vorherigen Abtrennung, was die Methodik für patientennahe Anwendungen attraktiv erscheinen lässt. Wir legen in diesem Kurzaufsatzz das Prinzip dar, nach dem die Zusammenlagerung von DNA-Molekülen mittels Affinitätsbindung erfolgt. Dabei stellen wir neuartige Anwendungen für den Nachweis von Proteinen beispielhaft heraus.

1. DNA-Assemblierung mittels Affinitätsbindung an den Analyten

Stellen wir uns eine Lösung vor, die je 1 nm zweier komplementärer kurzer Oligonucleotidstränge enthält, die jeweils mit einem Affinitätsliganden konjugiert sind (z.B. einem Antikörper oder ein Aptamer; Abbildung 1A). Ein kugelförmiges Volumen, das beide Moleküle enthält, hätte einen Inhalt von 1.7 Femtoliter (fL), und der Radius der Kugel beträge $r = (3V/4\pi)^{1/3} = [(3 \times 1\text{ L})/(4\pi \times 1\text{ nmol} \times 6.023 \times 10^{23}\text{ mol}^{-1})]^{1/3} = 734\text{ nm}$. Stellen wir uns nun vor, dass die beiden Affinitätsliganden an das Analytmolekül binden, z.B. ein Protein. Diese Bindung bringt die beiden komplementären Oligonucleotide an dasselbe Molekül, wobei der typische intramolekulare Abstand weniger als 10 nm beträgt. In einem Volumen von weniger als 10 nm Radius hätten die Oligonu-

cleotide lokale Konzentrationen von über 400 μM ($C = n/NV = n/[N(4\pi r^3/3)] = 1\text{ mol}/[6.023 \times 10^{23} \times 4\pi \times (10\text{ nm})^3/3]$; V ist das Kugelvolumen [näherungsweise 4.2 Zeptoliter ($4.2 \times 10^{-21}\text{ L}$)], N ist die Avogadro-Konstante]. Im Vergleich zur analytfreien Situation bedeutet dies eine 400000-fache Erhöhung der lokalen Konzentrationen der komplementären Oligonucleotide. Diese Erhöhung der lokalen Konzentration wird die Hybridebildung der komplementären Molekülstränge fördern und eine Stabilisierung des Hybirdzustands bewirken. Die Konzentrationssteigerung betrifft nur die DNA-Sondenmoleküle, die an den nachzuweisenden Analyten gebunden sind, während die Konzentrationen der nichtgebundenen DNA-Sondenmoleküle unverändert bleiben.

Die durch die Anbindung an den Analyten erreichte Stabilitätserhöhung lässt sich anhand der Schmelztemperaturen verdeutlichen (Abbildung 1B). Prinzipiell können die beiden kurzen, komplementären Sequenzen 5'-GCC-ACG(T)₂₀-3' und 5'-(T)₂₀CGTGGC-3' hybridisieren und einen Doppelstrang bilden. Der Doppelstrang ist jedoch bei Raumtemperatur nicht stabil, weil die geschätzte Schmelztemperatur (DissoziationsTemperatur, T_m) bei unter 10 °C liegt (quantitativ ermittelt mit dem IDT-Oligo-Analyzer für die Bedingungen: 1 nm DNA, 1 mM Mg²⁺ und 50 mM Na⁺).

[*] Dr. H. Zhang, Dr. F. Li, B. Dever, C. Wang, Prof. X.-F. Li, Prof. X. C. Le
Department of Laboratory Medicine and Pathology and Department
of Chemistry, University of Alberta
Edmonton, Alberta, T6G 2G3 (Kanada)
E-Mail: xc.le@ualberta.ca
Homepage: <http://www.ualberta.ca/~xcl>

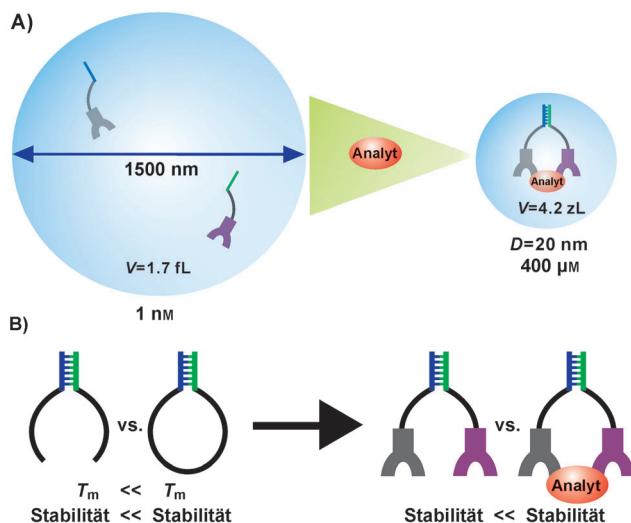


Abbildung 1. A) Die Bindung eines Analytmoleküls an zwei komplementäre Oligonukleotide erhöht die lokale Konzentration der Oligonukleotide und demzufolge auch die Stabilität des Hybridzustands. Bei einer Konzentration der beiden komplementären Oligonukleotide von 1 nm (ohne Analyt) befinden sich die beiden Moleküle in einem Kugelraum von 1.7 fL (Radius 734 nm). Die Bindung dieser Oligonukleotide an ein einzelnes Analytmolekül zwingt die beiden Oligonukleotide in ein Kugelvolumen von unter 10 nm Radius ($4.2 \times 10^{-21} \text{ L} = 4.2 \text{ Zeptoliter}$), und die lokalen Konzentrationen betragen nun 400 μm. B) Der intramolekulare Doppelstrang hat eine höhere Schmelztemperatur und ist stabiler als der entsprechende intermolekulare Doppelstrang bei gleicher Temperatur. Die Bindung der beiden Affinitätsliganden an das Analytmolekül führt zu einer stabileren intramolekularen Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide.

Bringt man die gleichen komplementären Sequenzen in einem einzelnen, größeren Oligonukleotid 5'-GCCACG-(T)₄₀CGTGGC-3' zusammen, entsteht durch intramolekulare Hybridisierung eine Stamm-Konformation („stem“). Die 40 T-Nukleotide, (T)₄₀, dazwischen bilden eine Schlaufe („loop“). Diese intramolekulare Stem-Loop-Struktur ist sehr viel stabiler; ihre Schmelztemperatur liegt bei 53 °C und ist damit signifikant höher als die des intermolekularen Doppelstrangs (< 10 °C).

Die Erhöhung der lokalen Konzentration ist die Ursache für den Anstieg der Schmelztemperatur im Fall der intramolekularen Hybridisierung. Sind die beiden komplementären Oligonukleotide über ein (T)₄₀-Segment miteinander verknüpft, sind sie in einem nanometergroßen Raum gefangen. Dies verhindert das Wegdiffundieren der Oligonukleotide und bedingt so einen drastischen Anstieg der lokalen Konzentration. Die Erhöhung der lokalen Konzentration begünstigt die Hybridisierung der beiden Oligonukleotide, sodass sich der Anteil der Doppelstrangmoleküle gegenüber den Einzelstrang-Oligonukleotiden beträchtlich erhöht. Man muss sich vergegenwärtigen, dass die Hybridmoleküle in Lösung dissoziieren und rehybridisieren (klassisches chemisches Gleichgewicht). Im intramolekularen Fall rehybridisieren die komplementären Sequenzen an den Enden des Moleküls nach einer Dissoziation schneller, weil ihre lokale Konzentration höher ist und keiner der Bindungspartner wegdiffundieren kann.

Im Umkehrschluss gilt, dass ein Doppelstrang der beiden kurzen Oligonukleotide nicht stabil ist, wenn die beiden Affinitätssonden nicht an ein Analytmolekül gebunden sind



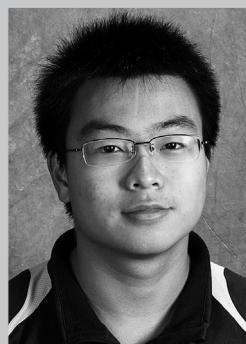
Hongquan Zhang studierte an der Northwest University, China (B.S. 1997; M.S. 1999), und promovierte 2009 an der University of Alberta bei Prof. X. Chris Le und Prof. Xing-Fang Li. Nach Forschungsanstaltungen am NRC Institute for Biological Sciences, Kanada, und an der University of Alberta wurde er 2012 zum Assistant Professor am Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Alberta, berufen. Seine Forschungen gelten der bindingsinduzierten DNA-Assemblierung und deren Anwendung zum Nachweis biologischer Analyte, der Konstruktion bindungsinduzierter DNA-Nanomaschinen und der Erzeugung funktioneller Nucleinsäuren.



Brittany Dever studierte an der Thompson Rivers University, Kanada, und erwarb 2010 ihren BSc im Hauptfach Chemische Biologie. Zurzeit promoviert sie in Chemie bei Professor X. Chris Le an der University of Alberta. Ihre Forschungen gelten der Entwicklung von patientennahen Sensoren auf der Grundlage der DNA-Nanotechnologie.



Feng Li studierte an der Tianjin University, China (B.S. 2006), und promovierte 2013 an der University of Alberta bei Professor X. Chris Le. Seine Forschungen gelten der Entwicklung diagnostischer Werkzeuge für verschiedene Biomarker auf der Grundlage der dynamischen DNA-Assemblierung sowie von DNA-Nanomaterialien für diagnostische und andere medizinische Anwendungen.



Chuan Wang studierte Biologie an der Wuhan University, China (BSc 2007), und promoviert zurzeit bei Dr. Xing-Fang Li an der University of Alberta. Seine Forschungen gelten der Entwicklung von Nachweissystemen für DNA-Addukte.

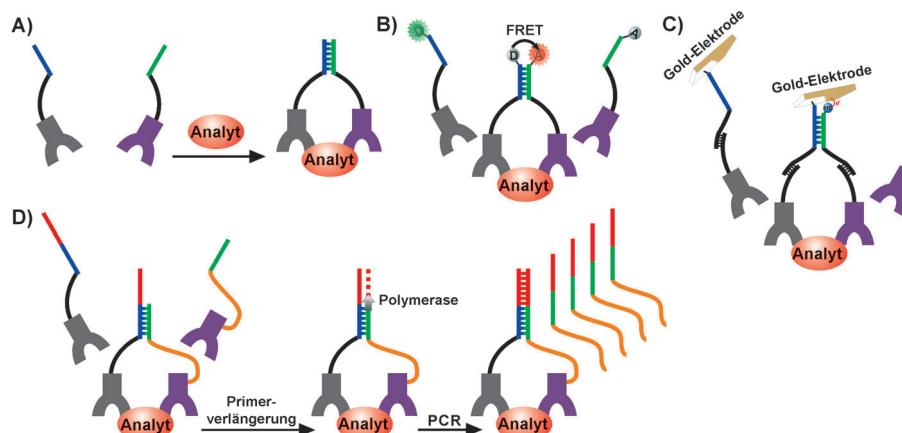


Abbildung 2. A) Allgemeines Prinzip des bindungsinduzierten DNA-Annealing-Assay.^[2,3,7–13] B) Bindungsinduzierter DNA-Annealing-Assay mit FRET als Ausgangssignal.^[2,7,9–12] C) Bindungsinduzierter DNA-Annealing-Assay mit elektrochemischer Detektion des Ausgangssignals.^[13] D) Bindungsinduzierter DNA-Annealing-Assay mit Primerverlängerung und PCR-Amplifikation.^[3]

(Abbildung 1B). Die Bindung des Analyten an die beiden Affinitätsliganden bringt die beiden komplementären Oligonukleotide in enge Nachbarschaft zueinander und ermöglicht so die Assemblierung am selben Molekül, was wiederum Folge der erhöhten lokalen Konzentrationen mit einhergehender Stabilisierung des Hybridzustands ist. Im Vergleich dazu bleiben die Konzentrationen komplementärer Oligonukleotide ungebundener Sondenkonstrukte viel niedriger, sodass sie nicht in der Lage sind, Einfluss auf die gebundenen komplementären Oligonukleotide zu nehmen. Durch die Anbindung an den (nachzuweisende) Analyten wird die Doppelstrangform der beiden kurzen Sequenzen sehr viel

stabil. Dieses Prinzip der bindungsinduzierten DNA-Hybridisierung lässt sich ausnutzen, um eine bindungsinduzierte Assemblierung von DNA-Sonden und DNA-funktionalisierten Nanomaterialien zu erreichen.

Mindestens zwei Sondenmoleküle müssen gleichzeitig an ein einzelnes Analytmolekül binden, um die DNA-Assemblierung auszulösen. Affinitätsliganden wie Antikörper und Aptamere, die mit komplementären DNA-Sequenzen konjugiert sind, initiieren die Ereignisse der Bindung und der Assemblierung der DNA. Die komplementären DNA-Sequenzen werden für gewöhnlich so entworfen, dass ihre Hybridisierung bei Abwesenheit des Analyten nicht stattfinden kann (oder weniger stabil ist). Beim Entwurf der komplementären DNA-Sequenzen sollten die Anzahl der Basen und Stapelwechselwirkungen der Basen in die Planung einbezogen werden, da die Stabilität eines DNA-Doppelstrangs von seiner Länge und Basensequenz abhängt. Da die Bindung an den Analyten die Hybridisierung gebundener DNA-Sondenmoleküle zu induzieren vermag und es bei ungebundenen Sondenmolekülen nicht zur Hybridisierung kommt, kann die bindungsinduzierte Assemblierung von doppelsträngigen DNA-Sonden zum ultraempfindlichen Nachweis spezifischer Analyte genutzt werden.



Xing-Fang Li ist Professorin für Analytische und Umwelttoxikologie an der Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta. Sie studierte an der Hangzhou University (B.Sc. 1983), der Chinese Academy of Sciences, Peking (M.Sc. 1986), sowie der Brock University (MSc 1990) und promovierte 1995 an der University of British Columbia, Kanada. Ihre Forschungen gelten den Wechselwirkungen von Proteinen mit niedermolekularen Verbindungen, der Selektion von DNA-Aptameren, der Detektion pathogener Mikroben und der Charakterisierung von Nebenprodukten der Trinkwasserdesinfektion.



X. Chris Le ist Professor und Direktor der Analytical and Environmental Toxicology Division an der Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta. Er ist Inhaber eines Inaugural Research Chair in Bioanalytical Technology and Environmental Health und Fellow der Royal Society of Canada. Seine Forschungen gelten der Entwicklung von DNA-Protein-Bindungsassays, Fluoreszenznachweisverfahren und Methoden zur Signalverstärkung für die Messung von Proteinen, DNA-Schäden und molekularen Wechselwirkungen.

2. Bindungsindizierte DNA-Annealing-Assays

Mehrere einfache, aber effektive bindungsinduzierte DNA-Annealing-Assays für Proteine wurden bereits entwickelt.^[2,3,7–13] Ihr Funktionsprinzip ist die drastische Erhöhung der lokalen effektiven Konzentration der DNA-Sondenmoleküle, wenn die an den DNA-Sonden anhängenden Affinitätsliganden an den nachzuweisenden Analyten binden. Die beiden komplementären DNA-Sonden werden allgemein so entworfen, dass sie zwei kurze, komplementäre Bereiche aufweisen (Abbildung 2A), deren T_m -Wert deutlich niedriger als die Experimentaltemperatur ist. Dadurch wird die intermolekulare Hybridisierung unter den DNA-Sondenmolekülen zurückgedrängt und die analytunabhängige Reaktion weitgehend unterdrückt. Nach der Inkubation der DNA-

Sonden mit dem Analyten führt die Bindung der beiden DNA-Sondenmoleküle mittels der Affinitätsliganden an dasselbe Analytmolekül zu einem starken Anstieg des T_m -Wertes infolge der Erhöhung der lokalen effektiven Konzentration. Dies resultiert in der Bildung eines stabilen intramolekularen DNA-Doppelstrangs. Der Analyt lässt sich indirekt durch die Quantifizierung der Menge der intramolekularen DNA-Doppelstrangmoleküle nachweisen.

Heyduk und Mitarbeiter nutzten das Prinzip der analyt-induzierten DNA-Assemblierung, um eine Klasse optischer Sensoren auf der Grundlage des resonanten Fluoreszenzenergietransfers (FRET) zu entwickeln (Abbildung 2B).^[2,7,9–12] Die Forscher entwarfen zunächst ein komplementäres Paar DNA-Sondenmoleküle und konjugierten diese mit einem Paar von Affinitätsliganden, die in der Lage waren, nichtüberlappende Epitope desselben Analytmoleküls zu erkennen. Eine der DNA-Sonden wurde dann mit einem Fluoreszenzdonor markiert, die andere mit einem Fluoreszenzakzeptor. Für einen effizienten FRET müssen der Fluoreszenzdonor und der Fluoreszenzakzeptor nah zueinander gebracht werden (Abstand ca. 5 nm), was nur dann eintritt, wenn die beiden DNA-Sonden hybridisieren. Die Bindung der Analytmoleküle an die beiden Sonden induzierte die DNA-Doppelstrangbildung und erzeugte so stabile DNA-Doppelstränge, was zu einem FRET führte. Durch Verwendung verschiedener Arten von Affinitätsliganden, darunter Antikörper, Peptide und Aptamere, konnten verschiedene Proteine wie Thrombin,^[2] Herzmuskel-Tropinin I,^[9] Insulin^[12] und das C-reaktive Protein^[10] mit Nachweisgrenzen im pm-Bereich detektiert werden.

Easley und Mitarbeiter kombinierten das Konzept des bindungsinduzierten DNA-Annealing mit einem elektrochemischen Nachweisystem und entwarfen auf diese Weise einen elektrochemischen Proximity-Assay (ECPA).^[13] Wie in Abbildung 2C dargestellt, wurde die eine DNA-Sonde über eine Thiol-Gold-Bindung an eine Goldelektrode gebunden, die andere DNA-Sonde wurde mit Methylenblau (MB) markiert. Die Bindung der beiden DNA-Sonden an dasselbe Analytmolekül mittels der Affinitätsliganden brachte das MB-Molekül in unmittelbare Nähe zur Goldelektrode, was zu einem Elektronenübergang vom MB auf die Goldelektrode und einem daraus folgenden Anstieg des elektrischen Stroms führte. Der Anstieg des elektrischen Stroms war proportional zur Konzentration des spezifischen Analyten. Aptamer-modifizierte DNA-Sonden wurden dazu verwendet, einen ECPA-Sensor für den Thrombin-Nachweis zu entwickeln. Antikörpermodifizierte DNA-Sonden wurden für den Insulin-Nachweis eingesetzt. Die erreichte Nachweisgrenze war 128 fm, der dynamische Bereich der Methode überstrich vier Zehnerpotenzen.

Der durch bindungsinduziertes Annealing gebildete DNA-Doppelstrang kann auch direkt mittels einer DNA-Polymerase-vermittelten Primerverlängerungsreaktion gefolgt von einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden (Abbildung 2D).^[3] Eine der beiden DNA-Sonden wurde mit einem langen Einzelstrangüberhang versehen (rot in Abbildung 2D), der als Primer der Verlängerungsreaktion dient. Bei Abwesenheit des Analyten sind die komplementären Bereiche der beiden DNA-Sonden zu kurz, um einen

stabilen Doppelstrang zu bilden, sodass keine Primerverlängerung erfolgen kann. In Gegenwart des Analyten erzeugt das bindungsinduzierte DNA-Annealing einen stabilen intramolekularen DNA-Doppelstrang, der als Primer für die Verlängerungsreaktion dient. Der durch die Primerverlängerungsreaktion gebildete neue DNA-Strang (rot-grün-orange in Abbildung 2D) wurde danach durch PCR amplifiziert, um das detektierbare Signal zu verstärken. Mithilfe dieser Strategie gelang es Liu und Mitarbeitern, Streptavidin bis hinab zu einer Konzentration von 200 zmol nachzuweisen. Sie entwickelten außerdem eine Multiplex-Version, die dazu geeignet ist, Liganden-Analyt-Paare aus Bibliotheken von Proteinen und niedermolekularen Verbindungen über einen breiten Affinitätsbereich hinweg zu detektieren.

Der intramolekulare DNA-Doppelstrang kann auch mittels Rolling-Circle-Amplifikation (RCA) amplifiziert werden. King und Mitarbeiter nutzten die Methode des bindungsinduzierten DNA-Annealings mit RCA für den Nachweis von Thrombin.^[8] Sie verwendeten dabei zwei DNA-Aptamere, von denen das eine mit der zirkulären DNA-Matrize verknüpft und das andere um einen 3'-Überhang erweitert war, der nur dann mit dem zirkulären Aptamer assembliert konnte, wenn beide Aptamere an dasselbe Thrombinmolekül gebunden waren. Nach der Aptamerbindung an das Thrombin wurde die RCA-Reaktion vom Einzelstrangüberhang aus in Gang gesetzt. Dadurch wird eine verlängerte DNA erzeugt, die aus Wiederholungseinheiten der Matrizensequenz besteht. Die lineare Amplifikation durch den Rolling-Circle-Mechanismus führte zu einer moderaten Nachweisgrenze von 30 pm Thrombin.

3. Proximity-Ligations-Assay

Bei der Methode des Proximity-Ligations-Assay (PLA) wird die Affinitätsbindung genutzt, um Sonden-Oligonukleotide in unmittelbare Nähe zueinander zu bringen, sodass eine Ligation der DNA möglich wird.^[1] Die Detektion eines Makromoleküls oder eines Komplexes wird in die Detektion von DNA-Molekülsträngen konvertiert, die durch die Ligation neu gebildeten werden.^[14] Ein Paar von DNA-Sondenmolekülen, die jeweils mit einem analytenspezifischen Affinitätsliganden konjugiert sind, wird durch zwei Bindungsergebnisse in unmittelbare Nähe zueinander gebracht.^[1] Die beiden Sonden-DNAs hybridisieren dann mit einem Konnektor-Oligonukleotid, wodurch die enzymatische Ligation der beiden Sonden-DNAs möglich wird (Abbildung 3A). Verschiedene Techniken können nun eingesetzt werden, um die neuen, ligierten DNA-Stränge zu amplifizieren und nachzuweisen.^[14] Da die Konzentration des Konnektor-Oligonukleotids für gewöhnlich mehr als 10000-mal höher ist als die Konzentrationen der DNA in den Affinitätssonden, findet eine Hybridisierung der beiden Sonden-DNAs mit dem Konnektor-Oligonukleotid nur dann statt, wenn beide Affinitätssonden an dasselbe Analytmolekül binden. Im Wesentlichen bedeutet das, dass durch die Affinitätsbindung die lokalen Konzentrationen der beiden Sonden-DNAs stark erhöht werden, sodass eine stabile Hybridisierung mit dem Konnektor-Oligonukleotid begünstigt wird. Eine stabile Hy-

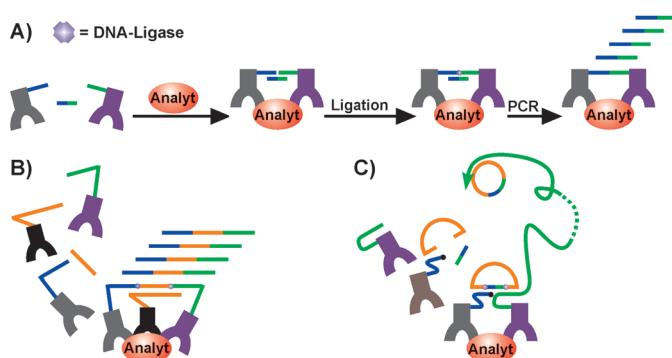


Abbildung 3. Varianten des Proximity-Ligations-Assay. A) Grundprinzip des PLA. B) 3PLA mit einem zusätzlichen Affinitätssliganden, der das Konnektor-Oligonucleotid trägt.^[15] C) In-situ-PLA mit einem zirkulärsierbaren Oligonucleotid für die Rolling-Circle-Amplifikation.^[17]

bridisierung der Sonden-DNAs mit dem Verbindungsstück ist Voraussetzung für die nachfolgende Bildung eines neuen DNA-Strangs durch Ligation. Ein Hintergrundsignal entsteht durch die analytunabhängige Hybridisierung von zwei Sonden-DNAs mit dem Konnektor-Oligonucleotid. Die Länge des Konnektor-Oligonucleotids erweist sich so als entscheidend für die Kontrolle des Signal-Rausch-Verhältnisses. Landegren und Mitarbeiter setzten diese Strategie in Kombination mit der Echtzeit-PCR (rt-PCR) ein, um Homodimere des Thrombocyten-Wachstumsfaktors (platelet-derived growth factor, PDGF-BB) nachzuweisen.^[1] Aptamere für PDGF-BB dienten als Affinitätssliganden und wurden zu Sonden-DNAs verlängert. Es gelang damit, 24000 PDGF-BB-Moleküle in einem Probenvolumen von 5 µL nachzuweisen.

Bei einer weiterführenden Strategie wurde das Konnektor-Oligonucleotid an einer dritten Affinitätssonde angebracht.^[15] Diese Variante wird als 3PLA bezeichnet, weil im Vergleich zum ursprünglichen Nachweissystem (2PLA) drei Affinitätssonden zum Einsatz kommen. Bei der 3PLA-Version erkennen drei mono- oder polyklonale Antikörper verschiedene Epitope des Zielmoleküls. Die Antikörper wurden kovalent mit drei Oligonucleotiden konjugiert (zwei Sonden-DNAs und ein Konnektor-Oligonucleotid), sodass drei Antikörper-Oligonucleotid-Konstrukte vorhanden sind. Die Bindung der drei Affinitätssonden an dasselbe Analytmolekül führt zur Hybridisierung der beiden Sonden-DNAs mit dem Konnektor-Oligonucleotid und einem Kassetten-Oligonucleotid, resultierend in zwei Ligationsereignissen. Der neue, ligierte DNA-Strang wurde dann amplifiziert und detektiert (Abbildung 3B). Die Notwendigkeit der Bindung dreier Affinitätssonden an das Analytmolekül erhöht die Spezifität und vermindert das Hintergrundsignal, wodurch die Nachweisempfindlichkeit um etwa das 100-fache gesteigert werden konnte. Mit dem 3PLA-Verfahren gelang für den vaskulären Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF) eine Nachweisgrenze von 60 Molekülen in einem Probenvolumen von 5 µL. Tavoosidana et al.^[16] entwickelten einen 4PLA-Ansatz zum Proteasom-Nachweis. Bei dem Verfahren werden vier Antikörper eingesetzt, die an vier unterschiedliche Proteine an der Oberfläche des Proteasoms binden. Jeder der Anti-

körper ist mit einem Sonden-Oligonucleotid konjugiert. Der Bindung der vier Sonden-Konstrukte an das Proteasom folgen zwei Ligationsereignisse, die einen neuen DNA-Strang erzeugen, der für die Detektion amplifiziert wird.

PLA-Methoden wurden mit Verfahren der RCA kombiniert (Abbildung 3C).^[17] Hierzu wurden zwei Affinitätssonden mit fixierten Zellen oder Gewebeproben inkubiert, und zwei Bindungssereignisse lösten die Ligation der zirkularisierten Sonde mit dem Konnektor-Oligonucleotid aus. Bei der Ligation bildet sich ein zirkuläres DNA-Produkt. Die zirkuläre DNA dient als Matrize für die RCA, wodurch Hunderte Wiederholungseinheiten gebildet werden, die nachfolgend mit Fluoreszenzsonden hybridisiert werden können. Dies erzeugt ein In-situ-Signal für die direkte Beobachtung mit dem Lichtmikroskop. In-situ-PLA wurde zum Nachweis von PDGF-Rezeptor β in der phosphorylierten Form^[18] und zum Screening von Inhibitoren des PDGF-Rezeptors β in Zellen^[19] eingesetzt. Das Verfahren wurde auch genutzt, um Protein-Protein-Wechselwirkungen, DNA-Protein-Wechselwirkungen^[20] und RNA-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen.^[21] So konnte etwa Mucin 2 (MUC2) als Hauptträger des tumorassoziierten Sialyl-Tn-Antigens in Magenkrebsgewebe nachgewiesen werden,^[22] und die extrazelluläre Domäne von MUC1 wurde als Assoziat mit Spleißösomen bestätigt.^[23] Eine Kombination aus In-situ-PLA und Durchflusszytometrie wurde eingesetzt, um Wechselwirkungen von EGF-Rezeptoren (epidermaler Wachstumsfaktor) mit HER2 sowie die Auswirkungen posttranslationaler Modifikationen nach Stimulation von Einzelzellen mit EGF nachzuweisen.^[24]

Beim Multiplex-PLA, der in Hochdurchsatz-Screenings zum Einsatz kommt, werden Sonden-DNAs als „Strichcodes“ genutzt.^[25–27] Die Strichcode-Sequenzen dienen als Primer für eine nachfolgende Quantifizierung mittels rt-PCR.^[25] Festphasen-PLAs wurden für Hochdurchsatzanalysen eingesetzt^[28,29] und waren in der Lage, Analyte in komplexen biologischen Matrices nachzuweisen.^[30–32] Das 2PLA-Verfahren wurde auch in Form eines Proximity-Verlängerungs-Assays (PEA) modifiziert, wobei die Verlängerung die Ligation ersetzt.^[33] Verschiedene PLA-Formate wurden zum Nachweis von Proteinen,^[1,34] Proteinkomplexen^[35] und einzelnen Viruspartikeln (Virionen),^[36] zum Screening von Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen^[37] und zur Ermittlung von Bindungsspezifitäten DNA-bindender Proteine (wie z. B. p53, HNF-4α) an verschiedene dsDNA-Sequenzen verwendet.^[38]

4. Nachweisverfahren auf der Grundlage von bindungsinduzierter DNA-Assemblierung

Wir haben das Verfahren der bindungsinduzierten DNA-Assemblierung (BINDA) entwickelt,^[4,39] das die Entwicklung ultraempfindlicher Assays sowie den Aufbau funktioneller Nanostrukturen ermöglicht. Das Prinzip besteht darin, dass die Bindung des Analyten die gerichtete Assemblierung von DNA-Motiven und DNA-modifizierten Nanomaterialien auslöst. Ohne den Analyten erfolgt keine Assemblierung, was sehr geringe Hintergrundsignale bedingt.

In einem ersten Ansatz verwendeten wir ein Proteinmolekül, das mit Aptameren oder Antikörpern zur Erkennung des Analytproteins konjugiert war, um die beiden DNA-Motive zu assemblieren.^[4,39] Zwei DNA-Motive wurden derart konstruiert, dass sie nur dann assemblieren, wenn ein spezifischer Analyt an das Aptamer oder den Antikörper bindet (Abbildung 4 A). Zu diesem Zweck haben wir DNA-Motive mit kurzen komplementären Sequenzen entworfen, die die Assemblierung der DNA-Motive vermittelten. Die Länge der komplementären Sequenzen wurde so optimiert, dass ihre Hybridisierung bei Abwesenheit des Analyten instabil ist. Werden die beiden DNA-Motive mittels Bindung an den Analyten angenähert, erhöht sich die lokale Konzentration der DNA-Motive drastisch, und durch Hybridisierung der komplementären Sequenzen wird eine geschlossene Schlaufe gebildet. DNA-Ligase wurde eingesetzt, um das 3'-

Ende des einen Motivs mit dem 5'-Ende des anderen zu einer neuen DNA-Sequenz zu verknüpfen, die dann mittels rt-PCR detektierbar war.

Um die analytunabhängige Assemblierung weiter zu minimieren, führten wir ein Paar von Oligonucleotiden mit blockierender Wirkung ein, deren Bindung mit der Hybridisierung der komplementären Sequenzen konkurriert. Die blockierenden Oligonucleotide wurden so entworfen, dass sie fünf Nucleotide länger waren als die komplementären Sequenzen, und wir setzten sie in viel höherer Konzentration ein als die DNA-Motive, was zu einem Verschwinden der analytunabhängigen Assemblierung führte. Durch diese Unterdrückung des Signalhintergrunds infolge analytunabhängiger DNA-Assemblierung waren wir in der Lage, Streptavidin, PDGF und das prostataspezifische Antigen (PSA) in Yotkomol- bis Zeptomol-Mengen nachzuweisen.^[4]

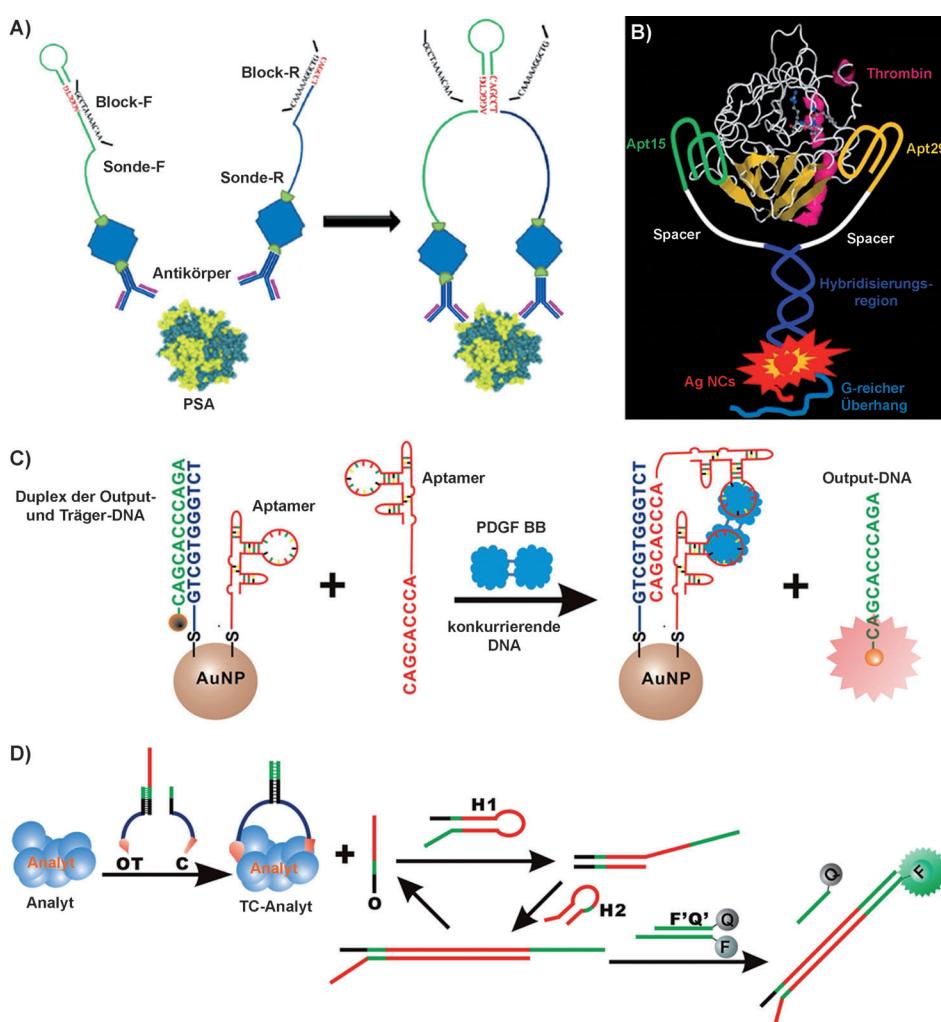


Abbildung 4. Assays auf der Grundlage der bindungsinduzierten DNA-Assemblierung (BINDA). A) BINDA eines ligenen Haarnadelmotivs, das für den Proteinnachweis per PCR amplifiziert wird.^[4,39] PSA = Prostata-spezifisches Antigen. Sonde-F und Sonde-R sind DNA-gebundene Affinitätsliganden, die vom Analytprotein erkannt werden. Block-F und Block-R sind blockierende Oligonucleotide, die die analytunabhängige Assemblierung zurückdrängen. Nachdruck aus Lit. [4]. B) BINDA zur Ermöglichung der Wechselwirkung von Silber-Nanoclustern (Ag-NCs) mit guaninreichen DNA-Sequenzen zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität.^[40] Nachdruck aus Lit. [40]. C) Bindungsinduzierte Strangverdrängungsreaktion auf einem Nanopartikel-Gerüst zur Aktivierung des Fluoreszenzsignals.^[5a] D) Bindungsinduzierte Strangverdrängungsreaktion, bei der die Output-DNA einen enzymfreien, katalytischen DNA-Schaltkreis in Gang setzt, der das detektierbare Signal verstärkt.^[5b] F = Fluorophor, Q = Quencher, OT = Output-DNA-Motiv, O = Output-DNA, C = konkurrierendes DNA-Motiv, T = Hilfs-DNA, H1 und H2 = DNA-Haarnadelstrukturen.

Wir haben das BINDA-Verfahren auch zur Verstärkung der Fluoreszenzintensität von Silber-Nanoclustern (AgNCs) durch die Wechselwirkung der AgNCs mit guaninreichen DNA-Sequenzen eingesetzt (Abbildung 4B). Das Verfahren wurde zum Thrombin-Nachweis genutzt.^[40] Die gleichzeitige Bindung von Thrombin an zwei Aptamersonden, von denen die eine mit einer AgNC-Nukleationssequenz und die andere mit einer guaninreichen DNA-Sequenz konjugiert war, führte zu einer bindungsinduzierten Hybridisierung der beiden komplementären Bereiche dieser Sequenzen. Die Hybridisierung brachte die guaninreiche Sequenz in unmittelbare Nähe zu den AgNCs, und die Wechselwirkung der AgNCs mit der guaninreichen Sequenz führte zu einer deutlichen Steigerung der Fluoreszenzintensität der AgNCs.

Bei einer anderen Anwendung der BINDA-Methode haben wir DNA-Motive auf einem Goldnanopartikel-(AuNP)-Gerüst assembliert und einen bindungsinduzierten molekularen „Übersetzer“ für den Protein-Nachweis entwickelt.^[5a] Der bindungsinduzierte molekulare Übersetzer wurde so entworfen, dass das als „Eingabesignal“ (input) wirkende Analytprotein durch bindungsinduzierte DNA-Strangverdrängung in eine Output-DNA umgewandelt wurde (Abbildung 4C). Der molekulare Übersetzungsapparat besteht aus Komponenten für die Analyterkennung und die Signalauslesung. Die Analyterkennung wird durch zwei Affinitätsliganden erreicht, die an dasselbe Zielprotein binden. Ein Affinitätsligand ist dabei mit dem AuNP, der zweite mit einer konkurrierenden Sonden-DNA konjugiert. Eine fluorophormarkierte Output-DNA wird mit einer Hilfs-DNA hybridisiert, die an das AuNP-Gerüst konjugiert ist. Anfänglich löscht das AuNP somit die Fluoreszenz des Fluorophors an der Output-DNA. Die konkurrierende DNA ist ebenfalls so ausgelegt, dass sie mit der Hilfs-DNA hybridisieren kann, doch ist sie um zwei bis vier Nucleotide kürzer als die Output-DNA. Bei Fehlen der Bindung an das Analytmolekül ist die Verdrängung der Output-DNA durch die konkurrierende DNA minimal. Beim Beispiel der Detektion von PDGF-BB führte die Bindung von PDGF-BB an die beiden Aptamermoleküle zur Assemblierung der konkurrierenden DNA am AuNP-Gerüst und erhöhte die lokalen effektiven Konzentrationen der Sonden-DNAs. Dies löste die DNA-Strangverdrängung der konkurrierenden DNA durch die Output-DNA aus, und im Ergebnis wurde die fluorophormarkierte Output-DNA vom AuNP-Gerüst freigesetzt und so das Fluoreszenzsignal aktiviert. Mit dieser Strategie waren wir in der Lage, subnanomolare Konzentrationen von Streptavidin und PDGF-BB ohne vorherige Abtrennungsschritte nachzuweisen.

Alternativ dazu kann die Output-DNA verwendet werden, um eine nachfolgende dynamische DNA-Assemblierung auszulösen, die in isothermer und enzymfreier Weise das Nachweissignal verstärkt.^[5b] Um einen bindungsinduzierten katalytischen DNA-Schaltkreis zu konstruieren (Abbildung 4D), haben wir ein Paar von DNA-Haarnadelstrukturen (H1 und H2) entworfen, die partiell miteinander hybridisiert sind. Die spontane Hybridisierung von H1 mit H2 war durch Einschluss der komplementären Sequenzen in den Stamm-Bereichen dieser Haarnadelkonformationen kinetisch gehemmt. In Gegenwart des Analyten wurde die Out-

put-DNA (O) durch die bindungsinduzierte DNA-Strangverdrängung freigesetzt. Die freigesetzte Output-DNA öffnete den Stamm-Bereich von H1 mittels Toehold-vermittelter Strangverdrängung. Der so zur Exposition gelangte Stamm-Teil von H1 wirkte als Nukleationsstelle für den Einzelstrangüberhang von H2 und löste so die nachfolgende Strangverdrängung aus, die abermals zur Freisetzung der Output-DNA führte. Die Output-DNA dient somit als Katalysator der Bildung des H1-H2-Doppelstrangs. Dieser Vorgang führt zur Verstärkung des Nachweissignals und ermöglichte eine Nachweigrenze von 10 pm für Streptavidin.^[5b]

5. Abschließende Bemerkungen

Die Assemblierung von Sonden-DNAs durch deren Bindung an ein Analytmolekül ist eine attraktive Strategie für die Detektion nichtamplifizierbarer Molekülsorten mithilfe von amplifizierbarer DNA. Die Idee war Auslöser für die Entwicklung zahlreicher ultraempfindlicher Methoden für den Proteinnachweis. So wurde z. B. rt-PCR verwendet, um die DNA-Assemblierung selbst nachzuweisen und so einen indirekten spezifischen Nachweis von Proteinen im Yektomol-Bereich zu erzielen.^[4,15] Mithilfe dieser ultraempfindlichen Nachweisverfahren gelingt die Detektion von in geringen Mengen auftretenden Proteinen, was von großem Interesse bei der Früherkennung von Krankheitsmarkern und Infektorregern sein kann. Jüngere Erfolge bei der Quantifizierung von 35 Zielproteinen in einer einzigen Lösung^[29] durch den Einsatz einer DNA-Assemblierungsstrategie in Verbindung mit einer PCR-Amplifizierung und folgender DNA-Sequenzierung zeigen das vielversprechende Potential für Parallel- und Hochdurchsatzanwendungen auf. Diese neuen Methoden ergänzen die Immuno-PCR^[41] und den Einzmolekünchnachweis.^[42]

Die hier beschriebenen Strategien beruhen auf Wechselwirkungen von zwei oder mehr unterschiedlichen Affinitäts sonden mit einem einzelnen Analytmolekül. Sowohl Antikörper wie Aptamere können als Affinitätssonden fungieren. Die Vorteile von Aptameren gegenüber Antikörpern sind eine bessere thermische Stabilität und ein leichterer Einbau in DNA-Motive. Die Verwendung von Aptameren war bislang jedoch dadurch eingeschränkt, dass nur wenige Aptamerpaare verfügbar sind, die ausreichend stark an ein einzelnes Proteinmolekül binden können. Die Entwicklung einer neuen Generation von Aptameren, den SOMAmeren, die auf eine hochaffine Bindung an Proteine selektiert wurden, könnte diese Einschränkung überwinden.^[43–45]

Die Assemblierung von Sonden-DNAs mittels Analyt bindung wurde bisher für den Nachweis von Molekülen, Organellen und Zellen sowie zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, Proteinmodifikationen und der Lokalisation von Proteinen in fixierten Zellen und Geweben eingesetzt.^[4,7,14] Wir prognostizieren, dass diese Technik auch für die Detektion und die Bildgebung von Proteinen in lebenden Zellen und in der patientennahen Diagnostik verwendet wird. Die Einbeziehung von Nanopartikeln mit ihren besonderen optischen Eigenschaften wird den Einsatzbereich der bindungsinduzierten Assemblierung ebenfalls erweitern.

Basierend auf jüngsten Fortschritten in der DNA-Nanotechnologie ist außerdem vorstellbar, dass bindungsinduzierte DNA-Nanofunktionseinheiten konstruiert werden.

Das grundlegende Prinzip, die Bindung an einen Analyten zur Steigerung lokaler Molekülkonzentrationen und zur Verstärkung molekularer Wechselwirkungen zu nutzen, ist nicht auf die Assemblierung von DNA für analytische Anwendungen beschränkt. Ein Beispiel ist die templatvermittelte organische Synthese, die die DNA-Hybridisierung zur Erhöhung lokaler Konzentrationen reagierender Moleküle zur Reaktionsführung nutzt.^[46–49]

Wir danken dem Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, den Canadian Institutes of Health Research, dem Canada Research Chairs Program, Alberta Health und Alberta Innovates für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 15. Dezember 2012,
veränderte Fassung am 17. März 2013
Online veröffentlicht am 26. August 2013
Übersetzt von Dr. Thomas Lazar, Paderborn

- [1] S. Fredriksson, M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. M. Gústafsdóttir, A. Ostman, U. Landegren, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 473–477.
- [2] E. Heyduk, T. Heyduk, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1147–1156.
- [3] L. M. McGregor, D. J. Gorin, C. E. Dumelin, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15522–15524.
- [4] H. Zhang, X.-F. Li, X. C. Le, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 877–884.
- [5] a) F. Li, H. Zhang, C. Lai, X.-F. Li, X. C. Le, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9451–9454; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9317–9320; b) F. Li, H. Zhang, Z. Wang, X. Li, X.-F. Li, X. C. Le, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2443–2446.
- [6] H. Zhang, F. Li, B. Dever, X.-F. Li, X. C. Le, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2812–2841.
- [7] T. Heyduk, *Biophys. Chem.* **2010**, *151*, 91–95.
- [8] D. A. Di Giusto, W. A. Wlassoff, J. J. Gooding, B. A. Messerle, G. C. King, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e64.
- [9] E. Heyduk, B. Dummit, Y.-H. Chang, T. Heyduk, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5152–5159.
- [10] L. Tian, T. Heyduk, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5218–5225.
- [11] E. Heyduk, T. Heyduk, *Anal. Biochem.* **2010**, *396*, 298–303.
- [12] E. Heyduk, M. M. Moxley, A. Salvatori, J. A. Corbett, T. Heyduk, *Diabetes* **2010**, *59*, 2360–2365.
- [13] J. Hu, T. Wang, J. Kim, C. Shannon, C. J. Easley, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7066–7072.
- [14] T. Conze, A. Shetye, Y. Tanaka, J. Gu, C. Larsson, J. Göransson, G. Tavoosidana, O. Söderberg, M. Nilsson, U. Landegren, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2*, 215–239.
- [15] E. Schallmeiner, E. Oksanen, O. Ericsson, L. Spångberg, S. Eriksson, U. H. Stenman, K. Pettersson, U. Landegren, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 135–137.
- [16] G. Tavoosidana, G. Ronquist, S. Darmanis, J. Yan, L. Carlsson, D. Wu, T. Conze, P. Ek, A. Semjonow, E. Eltze, A. Larsson, U. D. Landegren, M. Kamali-Moghaddam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8809–8814.
- [17] K. Leuchowius, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 995–1000.
- [18] M. Jarvius, J. Paulsson, I. Weibrech, K.-J. Leuchowius, A.-C. Andersson, C. Wählby, M. Gullberg, J. Botling, T. Sjöblom, B. Markova, A. Ostman, U. Landegren, O. Söderberg, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1500–1509.
- [19] K.-J. Leuchowius, M. Jarvius, M. Wickström, L. Rickardson, U. Landegren, R. Larsson, O. Söderberg, M. Fryknäs, J. Jarvius, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 178–183.
- [20] I. Weibrech, M. Gavrilovic, L. Lindbom, U. Landegren, C. Wählby, O. Söderberg, *New Biotechnol.* **2012**, *29*, 589–598.
- [21] J. Jung, A. W. Lifland, C. Zurla, E. J. Alonas, P. J. Santangelo, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e12.
- [22] T. Conze, A. S. Carvalho, U. Landegren, R. Almeida, C. A. Reis, L. David, O. Söderberg, *Glycobiology* **2010**, *20*, 199–206.
- [23] P. Kumar, L. Lindberg, T. L. Thirkill, J. W. Ji, L. Martsching, G. C. Douglas, *PloS One* **2012**, *7*, e42712.
- [24] K.-J. Leuchowius, I. Weibrech, U. Landegren, L. Gedda, O. Söderberg, *Cytometry Part A* **2009**, *75A*, 833–839.
- [25] S. Fredriksson, W. Dixon, H. Ji, A. C. Koong, M. Mindrinos, R. W. Davis, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 327–329.
- [26] S. Fredriksson, J. Horecka, O. T. Brustugun, J. Schlingemann, A. C. Koong, R. Tibshirani, R. W. Davis, *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 582–589.
- [27] M. Lundberg, S. B. Thorsen, E. Assarsson, A. Villalba, B. Tran, N. Gee, M. Knowles, B. S. Nielsen, E. González Couto, R. Martin, O. Nilsson, C. Fermer, J. Schlingemann, I. J. Christensen, H. J. Nielsen, B. Ekström, C. Andersson, M. Gustafsson, N. Brunner, J. Stenvang, S. Fredriksson, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, M110.004978.
- [28] M. Hammond, R. Y. Nong, O. Ericsson, K. Pardali, U. Landegren, *PloS One* **2012**, *7*, e40405.
- [29] S. Darmanis, R. Y. Nong, J. Vänelid, A. Siegbahn, O. Ericsson, S. Fredriksson, C. Bäcklin, M. Gut, S. Heath, I. G. Gut, L. Walentin, M. G. Gustafsson, M. Kamali-Moghaddam, U. Landegren, *PloS One* **2011**, *6*, e25583.
- [30] M. Kamali-Moghaddam, F. E. Pettersson, D. Wu, H. Englund, S. Darmanis, A. Lord, G. Tavoosidana, D. Sehlin, S. Gustafsson, L. N. Nilsson, L. Lannfelt, U. Landegren, *BMC Neurosci.* **2010**, *11*, 124.
- [31] S. Darmanis, R. Y. Nong, M. Hammond, J. Gu, A. Alderborn, J. Vänelid, A. Siegbahn, S. Gustafsson, O. Ericsson, U. Landegren, M. Kamali-Moghaddam, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 327–335.
- [32] L. Zhu, H. Koistinen, P. Wu, A. Närvenänen, E. Schallmeiner, S. Fredriksson, U. Landegren, U.-H. Stenman, *Biol. Chem.* **2006**, *387*, 769–772.
- [33] M. Lundberg, A. Eriksson, B. Tran, E. Assarsson, S. Fredriksson, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, e102.
- [34] M. Gullberg, S. M. Gústafsdóttir, E. Schallmeiner, J. Jarvius, M. Bjarnegård, C. Betsholtz, U. Landegren, S. Fredriksson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8420–8424.
- [35] L. Zhu, H. Koistinen, U. Landegren, U.-H. Stenman, *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 1665–1675.
- [36] S. M. Gustafsson, A. Nordengrahn, S. Fredriksson, P. Wallgren, E. Rivera, E. Schallmeiner, M. Merza, U. Landegren, *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1152–1160.
- [37] S. M. Gustafsson, S. Wennström, S. Fredriksson, E. Schallmeiner, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, U. Landegren, *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 1218–1225.
- [38] S. M. Gustafsson, J. Schlingemann, A. Rada-Iglesias, E. Schallmeiner, M. Kamali-Moghaddam, C. Wadelius, U. Landegren, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3067–3072.
- [39] „Binding-induced hairpin detection system“: X. C. Le, H. Zhang, X.-F. Li, U.S. patent 61/238,368, **2009**. International Publication Number WO 2011/022820A1. Published on March 3, **2011**.
- [40] J. Li, X. Zhong, H. Zhang, X. C. Le, J.-J. Zhu, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5170–5174.
- [41] a) T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Science* **1992**, *258*, 120–122; b) M. Adler, R. Wacker, C. M. Niemeyer, *Analyst* **2008**, *133*, 702–718.
- [42] a) A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 898–915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 874–890; b) C. Blum, V. Subramaniam, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 527–541; c) M. Hintersteiner, M. Auer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**,

- 1130, 1–11; d) X. S. Xie, P. J. Choi, G. W. Li, N. K. Lee, G. Lia, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 417–444.
- [43] L. Gold, D. Ayers, J. Bertino, C. Bock, A. Bock, E. N. Brody, J. Carter, A. B. Dalby, B. E. Eaton, T. Fitzwater, D. Flather, A. Forbes, T. Foreman, C. Fowler, B. Gawande, M. Goss, M. Gunn, S. Gupta, D. Halladay, J. Heil, J. Heilig, B. Hicke, G. Husar, N. Janjic, T. Jarvis, S. Jennings, E. Katilius, T. R. Keeney, N. Kim, T. H. Koch, S. Kraemer, L. Kroiss, N. Le, D. Levine, W. Lindsey, B. Lollo, W. Mayfield, M. Mehan, R. Mehler, S. K. Nelson, M. Nelson, D. Nieuwlandt, M. Nikrad, U. Ochsner, R. M. Ostroff, M. Otis, T. Parker, S. Pietrasiewicz, D. I. Resnicow, J. Rohloff, G. Sanders, S. Sattin, D. Schneider, B. Singer, M. Stanton, A. Sterkel, A. Stewart, S. Stratford, J. D. Vaught, M. Vrkljan, J. J. Walker, M. Watrobka, S. Waugh, A. Weiss, S. K. Wilcox, A. Wolfson, S. K. Wolk, C. Zhang, D. Zichi, *PLoS One* **2010**, *5*, e15004.
- [44] L. Gold, J. J. Walker, S. K. Wilcox, S. Williams, *New Biotechnol.* **2012**, *29*, 543–549.
- [45] J. D. Vaught, C. Bock, J. Carter, T. Fitzwater, M. Otis, D. Schneider, J. Rolando, S. Waugh, S. K. Wilcox, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4141–4151.
- [46] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4956–4979; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848–4870.
- [47] Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, *305*, 1601–1605.
- [48] Y. He, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9972–9975.
- [49] Y. He, D. R. Liu, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 778–782.